

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-332217

(43)公開日 平成8年(1996)12月17日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00			A 6 1 L 27/00	F
A 6 1 F 2/28			A 6 1 F 2/28	

審査請求 有 請求項の数10 OL (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平7-329312
(62)分割の表示 特願平1-256922の分割
(22)出願日 平成1年(1989)9月29日

(31)優先権主張番号 250, 952
(32)優先日 1988年9月29日
(33)優先権主張国 米国 (US)
(31)優先権主張番号 275, 215
(32)優先日 1988年11月23日
(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 591223079
コラーゲン・コーポレーション
COLLAGEN CORPORATION
アメリカ合衆国カリフォルニア州94303、
バロ・アルト、フェイバー・プレイス2500
番
(72)発明者 ジョージ エイチ. チュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94087
サニーベール、キンロス コート 510
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 移植体固定の改良方法

(57)【要約】

【課題】 応力を支持する骨の取替えまたは部分的な取替えを行うための応力支持補綴物は、骨形成因子抽出物または精製された骨形成誘発タンパクと組合せて、また必要に応じて薬学的に容認し得る担体に含有させたTGF- β 補因子と組合せて、多孔質領域を有する応力支持部材を提供する。

【解決手段】 骨の取替え部材として移植するための骨誘発補綴物であって、薬学的に容認し得る担体中に含有させた有効量の骨形成因子抽出物 (OFE)、および多孔質の応力支持部材であって該部材の細孔中への骨の内方成長によって移植適所に固定され得る部材を有し、ここで該担体中の該OFEが該応力支持部材の細孔中に均一に分散している補綴物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 骨の取替え部材として移植するための骨誘発補綴物であって、薬学的に容認し得る担体中に含有させた有効量の骨形成因子抽出物（OFE）、および、多孔質の応力支持部材であって該部材の細孔中への骨の内方成長によって移植適所に固定され得る部材を有し、ここで該担体中の該OFEが該応力支持部材の細孔中に均一に分散している、補綴物。

【請求項2】 前記応力支持部材が、チタン、ステンレス鋼、あるいはチタン、コバルト、クロム、またはモリブデンを含有する合金でなる群から選択される金属または金属合金を含み、前記OFEと前記担体との重量比が約1：5～1：100である、請求項1に記載の補綴物。

【請求項3】 前記薬学的に容認し得る担体がコラーゲンを含む、請求項1に記載の補綴物。

【請求項4】 前記薬学的に容認し得る担体が、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、またはそれらの混合物でなる群から選択されるセラミックである、請求項1に記載の補綴物。

【請求項5】 骨の取替え部材として移植するための骨誘発補綴物であって、有効量の実質的に純粋な骨誘発タンパク；有効量のTGF- β ；薬学的に容認し得る担体；および多孔質の応力支持部材；を有し、ここで該骨誘発タンパク、該TGF- β および該担体が、該応力支持部材の細孔中に均一に分散している、補綴物。

【請求項6】 哺乳動物へ移植するための骨取替え用応力支持補綴物であって、多孔質領域を有する応力支持部材であって移植後に該多孔質領域において骨が内方成長することによって移植適所に固定され得る部材を有し、以下の工程を包含するプロセスにより調製される補綴物：繊維状コラーゲンに含有させた骨誘発に有効な量の骨形成因子抽出物（OFE）を、該応力支持部材の細孔中に付与する工程；および該繊維状コラーゲン中の該OFEを乾燥させる工程；ここで該付与および該乾燥工程は、該繊維状コラーゲン中の該OFEが該応力支持部材の該多孔質領域に均一に分散されるように行われる。

【請求項7】 哺乳動物へ移植するための骨取替え用応力支持補綴物であって、多孔質領域を有する応力支持部材であって移植後に該多孔質領域において骨が内方成長することによって移植適所に固定され得る部材を有し、以下の工程を包含するプロセスにより調製される補綴物：繊維状コラーゲンに含有させた骨誘発に有効な量の精製された骨誘発タンパクを、該応力支持部材の細孔中に付与する工程；および該繊維状コラーゲン中の該精製された骨誘発タンパクを乾燥させる工程；ここで該付与および該乾燥工程は、該繊維状コラーゲン中の該精製された骨誘発タンパクが該応力支持部材の該多孔質領域に均一に分散されるように行われる。

【請求項8】 多孔質領域を有する応力支持部材であって移植後に該多孔質領域において骨が内方成長すること

によって移植適所に固定され得る部材を有する、哺乳動物へ移植するための骨取替え用応力支持補綴物を調製する方法であって、以下の工程を包含する方法：繊維状コラーゲンに含有させた骨誘発に有効な量の骨形成因子抽出物（OFE）を、該応力支持部材の細孔中に付与する工程；および該繊維状コラーゲン中の該OFEを乾燥させる工程；ここで該付与および該乾燥工程は、該繊維状コラーゲン中の該OFEが該応力支持部材の該多孔質領域に均一に分散されるように行われる。

【請求項9】 多孔質領域を有する応力支持部材であって移植後に該多孔質領域において骨が内方成長することによって移植適所に固定され得る部材を有する、哺乳動物へ移植するための骨取替え用応力支持補綴物を調製する方法であって、以下の工程を包含する方法：繊維状コラーゲンに含有させた骨誘発に有効な量の精製された骨誘発タンパクを、該応力支持部材の細孔中に付与する工程；および該繊維状コラーゲン中の該精製された骨誘発タンパクを乾燥させる工程；ここで該付与および該乾燥工程は、該繊維状コラーゲン中の該精製された骨誘発タンパクが該応力支持部材の該多孔質領域に均一に分散されるように行われる。

【請求項10】 前記付与工程が減圧下で行われる、請求項8または9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、応力を支持する骨の取替え部材と、このような取替え部材を骨の欠陥部位に永続的に取付ける方法とに関する。特に、本発明は、多孔質の応力支持移植体に対する骨の内方成長を誘発する精製骨タンパクの使用と、該多孔質移植体の治療部位への固定法とに関する。

【0002】

【従来の技術】 骨の取替えに応力支持部材を使うことは、よく知られている。骨幹、関節、および歯根のような、応力を支持する骨格構造の欠失部もしくは患部を取替える多数のデザインが用いられている。これらのデザインには、人工の骨幹、関節、およびヒトの骨格システムの機能に似せるのを目的とする関連器具が含まれる。これらのデザインには、全く精巧なものがある（例えば、人工股関節のデザインを開示した米国特許第3,820,167号を参照）。

【0003】 骨の取替え部材の応力支持部分として用いる骨幹などの人工補綴物は、一般に金属もしくは金属合金で構成されている。このような金属製のピンもしくは人工関節は、チタン；ステンレス鋼類；またはコバルト、クロム、およびモリブデンのような金属の合金のとき適切な不活性金属で構成されている。金属製のピンもしくは関節は、腐食と不安定になるのを防止するために、しばしば酸化物の被覆が施される。

【0004】 上記のような金属製移植体を用いる際に

は、その位置を隣接する骨に対して固定し、位置が所定位置からずれるのを防止する機構を与える必要がある場合が多いことが認められている。セメントを用いて上記の固定を行う試みがなされている。1980年5月15日付で公開されたソ連邦特許出願第733,665号は、軟骨、コラーゲン（起源は不特定）、および患者の血液の混合物を含有し、移植されたピンを所定位置に固定するのに使用される移植体固定セメントを開示している。

【0005】骨の発育を促進し、その結果、移植体を骨の内方成長によって固定するといわれている物質〔「バイオグラス (bioglass)」〕で補綴物を被覆する方法が、1978年10月13日付で公開されたフランス特許出願公報第2,383,656号に開示された。また、補綴物の応力支持部材を囲む金網を使用して、しっかりした嵌合を得るのに十分な屈曲性を与え、ある場合には別の金属片で補助する試みもなされている（例えば、1983年2月9日付で公開された欧州特許出願公報第071,242号）。この網とともに、生物分解性で生物適合性の物質（例えば、非特定起源のコラーゲン）が、移植体を挿入中、金網に損傷を与えるのを防止するために採用されているようである。その結果、移植体は、最終的にその後の骨の成長によって固定される。実際に、研究結果は、多孔質金属または多孔質セラミックの表面を有する補綴物は、骨の成長によってその多孔質表面に一層良好に固定されるということを一貫して示している。

【0006】骨粒子による被覆を行うことによって、上記の骨の内方成長を刺激する試みがなされている。米国特許第3,918,100号には、RFスパッタリング法を用いて、減圧下、骨の粒子で被覆された種々の金属で製造された補綴物が記載されている。この開示では、酸化アルミニウムの基体が、アルカリ液で処理された骨片から製造された粉末で被覆されている。この被覆された補綴物は、生きている骨が移植体内に成長し、かつ被覆が最終的に周囲の組織によって吸収されることを促進するといわれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記のものには、いずれも満足すべき解決法が得られていない。使用される物質は免疫原性の場合が多く、補綴物のずれによる損傷を防止するのに十分な速度で周囲の骨が成長するよう誘発もしくは刺激することができない。本発明は、より満足すべき結果を得るのに十分な速度で骨が内方成長するように刺激する補綴物を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】移植された応力支持補綴物は、骨格系の残っている部分に支持補綴物を確実に永続的に取付ける手段を備えていなければならないが、理想的には、周囲の骨を移植体の多孔質表面に侵入するように誘発して移植体を所定の位置に固定する手段を備えているべきである。本発明は、迅速に固定するのに充分

な速度で骨が成長するのを誘発する有効な補綴物を提供するものである。

【0009】本発明のある局面は、薬学的に容認し得る担体に含有させた有効量の骨形成因子抽出物(OFE)を組み合わせた応力支持部材を有し、骨の取替え部材（または部分的取替え部材）として移植に用いる補綴物である。

【0010】本発明の他の局面は、薬学的に容認し得る担体と組合わせた実質的に純粋な骨形成活性タンパクと有効量のTGF- β とを、組合わせた応力支持部材を有し、骨取替え部材として移植に用いる補綴物である。

【0011】本発明の他の局面は、薬学的に有効な担体に含有させた有効量のOFEを投与することによって応力支持部材に対する骨の内方成長を誘発することにより、応力支持補綴物を永続的に固定する方法である。

【0012】本発明の他の局面は、薬学的に容認し得る担体と組合わせた実質的に純粋な骨形成活性タンパクと有効量のTGF- β とを投与することによって応力支持部材に対する骨の内方成長を誘発することにより、応力支持補綴物を永続的に固定する方法である。

【0013】本発明の他の局面は、薬学的に容認し得る担体に含有させた有効量のOFEと組合わせた応力支持部材を含有する骨取替え組成物を投与することからなる骨の欠陥部を修復する方法である。

【0014】本発明の他の局面は、薬学的に容認し得る担体と組合わせた実質的に純粋な骨形成活性タンパクと有効量のTGF- β とを組合わせた応力支持部材を含有する骨取替え組成物を投与することを包含する、骨の欠陥部を修復する方法である。

【0015】本発明の他の局面は、本発明の応力支持補綴物を製造する方法である。

【0016】

【発明の実施の形態】

A. 1. 補綴物の応力支持部材

本発明の補綴物は、薬学的に容認し得る担体に含有させた、無菌で非免疫原性の骨形成活性を有するタンパクを組合わせた応力支持部材を含む。応力支持部材自体は、本発明を構成せず、通常使用されているか、または操作可能な応力支持補綴物を使用することができる。このような補綴物は、一般に金属製か、またはセラミック製であり、また当該技術分野で周知の適切な技術によって多孔質表面が設けられている。応力支持部材自体としては、骨幹部を取替えるのに用いる単純なピンから、かなり複雑な人工関節や人工歯根までが含まれる。これらの部材は、セラミック、金属、移植される取り替え骨などで製造されている。また、これらの部材は、患部の骨の取替え、欠陥部の修正、または歯の固定などのそれぞれを目的とする用途に適切なデザインと材料とからなる部材である。本願で用いる「応力支持部材」という用語は、本発明の補綴物の通常硬質の構造要素を意味する。

応力支持部材は、この部材で取替えられている天然の骨が通常受けている物理的応力（例えば、ねじりや圧縮などの応力）に耐えることができないなければならない。

【0017】本発明に用いられる応力支持部材としては、骨の内方成長が望まれる多孔質領域を持っているものが好ましい。例えば、人工の股関節は、一般に、大腿骨頭と骨盤のソケットに代わる滑らかな球関節で構成され、骨盤と大腿骨の骨幹とに固定する金属柱を備えている。このような移植体において、金属柱は、細孔を、多孔質表面層または全金属柱を貫通する細孔として備えているが、その移植体の他の表面は滑らかである（例えば、関節面、人工大腿骨頭の非固定部分など）。したがって、本願で用いられる「多孔質の応力支持部材」は、部材の少なくとも一部に細孔を備えている。

【0018】A. 2. 補綴物の骨誘発成分
骨誘発活性を示し、かつ異種の宿主内で低免疫原性であるのに十分な純度の基準に合致するタンパクを含有する粗抽出物は、いくつもの方法で調整することができる。

【0019】本願発明の骨誘発タンパクの天然の原料は、骨、象牙質、骨肉腫および軟骨肉腫である。ヒト、サル、ウシおよびラット由来の骨誘発タンパクが、異種の移植体内に軟骨性の骨を産生する能力については、非種特異的であることからみて（T.K. Sampathら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、80巻、6591頁、1983年）、本願発明のタンパクは、哺乳類の種に高度に保持されていると考えられる（すなわち、異なる哺乳類の種由来のタンパクは実質的に相同のアミノ酸配列をもっているが、その配列は、変化するとしても1つ以上のアミノ酸残基が、付加、欠失または置換するが、その分子の非種特異的骨誘発活性を損なうような影響を与えない）。この点について、本願に用いられる「実質的に同等」と「実質的に相同」という用語は、起源の種にかかわらず、本願に記載したタンパクと同じアミノ酸の組成もしくは配列を有するタンパクと、類似しているが異なるアミノ酸組成もしくは配列を有し、その差が、非種特異的な軟骨内骨誘発活性を損なう影響を与えないタンパクとを意味する。従って、このようなタンパクは、多様な哺乳類が起源の細胞もしくは組織から得ることができる。天然原料から精製して調製されるタンパクの原料としては、ブタもしくはウシの長骨が、容易に入手できることから有利である。

【0020】好ましい実施態様において、部分的に精製された骨誘発タンパクは、米国特許第4,627,982号（参考文献としてここに引用されている）に記載されているような、脱塩された骨（DMB）から得られる。その精製法には、簡単に述べれば次の工程が含まれる：

- (1) 非繊維質タンパクを可溶化するカオトロピック（解離性の）抽出剤で脱塩骨を抽出する；
- (2) 得られた抽出物をゲル濾過して、分子量が20,000～36,000ダルトン（20～36kd）のタンパクを含有する画分を

回収する；

(3) 回収した画分を、pH約4.5～5.5でカルボキシメチルセルロースカオチン交換体に吸着させる；次いで

(4) 骨形成画分を、カオチン交換体から、約10mMから約150mMへの塩化ナトリウムの勾配液で溶出する。

【0021】得られた骨形成因子抽出物（OFE）は、補綴物の応力支持部材に対して骨の内方成長を有効に誘発する量（「骨形成有効量」）で本発明に用いることができる。一般に、この発明の方法に用いられる、OFEと担体との比は、約1：5～1：100の範囲である。本発明の最終組成物としては、移植体の表面積1cm²当り約50～200μgのOFEを含有するものが好ましく、最も好ましくは、約100μg/cm²である。

【0022】他の好ましい実施態様において、上記の抽出物は、その10mM～150mMのNaCl画分を、逆相HPLC（RP-HPLC）に付すか、または非変性ゲル電気泳動法に付すことによってさらに精製される。この精製された骨誘発タンパク（OIP）は、本出願人による1988年4月6日出願の米国特許出願第178,133号に記載されている。このタンパクは、SDS-PAGE分析法で測定して約20～28kdの分子量（そのグリコシル化した状態での分子量）を有し、N末端部の1/2の部分的なアミノ酸内部配列は以下のとおりである：

—Lys—Tyr—Asn—Lys—Ile—Lys—Ser—Arg—Gly—Ile—Lys—Ala—Asn—Thr—Phe—Lys—Lys—Leu—His—Asn—Leu—Ser—Phe—X—Tyr—Thr—Asp—His—Asn—Ala—Leu—Glu—

ここでXは不特定のアミノ酸を示す。本願で用いられる「OIP」という用語には、上記の骨誘発タンパクと、このタンパクに実質的に同等および実質的に相同で、実質的に純粋なタンパクが含まれる。「実質的に純粋な」という用語は、混入している非骨形成タンパクが約30重量%より少なく、好ましくは約10重量%より少なく、最も好ましくは約5重量%より少ない組成物を意味する。

「実質的に純粋な」という用語は、そのタンパクが天然に結合しているタンパクに対して用いられ、骨形成タンパクが、タンパク様もしくは非タンパク様の製薬用の担体もしくは賦形剤と混合されている組成物も含まれる。本発明は、さらに新規な、部分的にグリコシル化された形態、または全くグリコシル化されていない形態の骨形成タンパクを提供する。

【0023】精製OIPの単離法を簡単に述べると次の通りである：

- (1) 上記の10mM～150mMのNaCl画分を架橋されたConAのカラム上に吸着させる；
- (2) 結合したタンパクをカラムから溶出させる；
- (3) ステップ(2)の溶出物をヘパリン—セファロース（登録商標）カラム上に吸着させる；
- (4) ステップ(3)のカラムから、結合したタンパクを溶出させる；そして
- (5) ステップ(4)の溶出物をトリフルオロ酢酸—アセトニ

トリル系を用いてRP-HPLCカラム上でクロマトグラフィ分析を行い。実質的に純粋な骨形成活性タンパク組成物を約42~45%アセトニトリルによる溶出画分として回収する。

【0024】さらに本発明の骨形成タンパクの特徴付けは当該分野で周知の方法を使用して実施される。等電点電気泳動パターン、等電点、タンパク分解酵素あるいは他の化学物質（酸または塩基）による変性に対する感受性、他の物質（例えば、他のレクチン）に対する親和性などを当該技術分野で周知の方法を使用して測定する。精製タンパクに関しては、本発明の調製方法で使用される骨形成タンパクと担体の重量比は約1:5,000~1:50,000の範囲である。

【0025】骨形成タンパク組成物の最初の試験から、非骨性部位に骨を誘発する目的でTGF- β 活性を有する補因子タンパクを、テストした濃度と処方で同時投与することが好ましいことが示されている。この点に関して、TGF- β (TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 類の他の物質、およびそれらの混合物)は抗炎症活性、老化活性などの補助的活性によって骨誘発過程を増強する。このような活性を発揮する他の分子も骨誘発補因子として有用である。

【0026】勿論、補因子タンパクは異なった種々の濃度で、あるいは他の処方でも活性である。さらに骨性部位では、活性部位に存在する内因性TGF- β の量が充分であるので、TGF- β を同時投与する必要はない。組成物中における骨形成タンパクとTGF- β との重量比は一般に約10:1~1:10の範囲である。

【0027】TGF- β 類の調製法は、1988年9月27日に発行された米国特許第4,774,322号（参考としてここに引用する）に記載されている。

【0028】本発明の骨形成タンパクは、通常骨形成に有効な量で、薬学上容認し得る固形または液体担体とともに処方される。好ましくは、処方物は骨と軟骨を発育させるための構造を提供しうるマトリックスを含有している。使用可能なマトリックスは生分解性、あるいは非生分解性であり、化学的あるいは生物学的に限定され得る。

【0029】好ましい薬学的に容認し得る担体は、精製されたアテロペプチドコラーゲンである。このようなコラーゲンの市販の製剤としては、Collagen Corporation, (Palo Alto, California)から商品名バイトロジェン100 (Vitrogen (登録商標) 100)のコラーゲン溶液(CIS)が入手できる。骨形成タンパクを送達するのに使用されるコラーゲン製剤の必要条件は、そのコラーゲンが非免疫原性であるということのみで、好ましくは非コラーゲン物質の混在していないアテロペプチドコラーゲンである。好ましい実施態様では本発明の方法で使用される溶液中のコラーゲン濃度は、約1~10mg/ml、最も好ましくは約3mg/mlである。CISをリン酸緩衝液で再構成し

て、繊維状コラーゲン担体を得る。ここで、好ましい組成物は約65mg/mlの繊維状コラーゲンを含有する。

【0030】他の好ましい薬学的に容認される担体としては、硫酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、ポリオルトエステル類、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体、バイオガラス (bio-glass) などがある。

【0031】A. 3. 骨誘発補綴物の調製

応力支持部材と骨誘発組成物を組み合わせるために多くの方法が使用可能である。最も簡単な方法は、応力支持部材を、OFE溶液または骨形成タンパクとTGF- β を含有する分散体で被覆するか、またはこれらに浸すことである。骨の内方成長によって固定される応力支持部材の一部を完全に覆うに十分な量のOFE、または骨形成タンパクとTGF- β を含有する分散体が付与される。代わりに、十分な量の骨誘発組成物を付与して、応力支持部材を完全に飽和させてもよい。

【0032】好ましい実施態様としては、OFE溶液または骨誘発タンパクとTGF- β を含有する分散体を減圧による力を使用して応力支持部材に付与する。実際には、OFEまたは骨誘発分散体を応力支持部材の細孔に均一に分散させる。溶液あるいは分散体から水分が分離するのを防ぐため、正の機械的な力（例えば材料を細孔に押し込む、あるいは詰めるような力）よりも減圧による力が好ましい。過度の減圧は同様の望ましくない結果を引き起こす。ここで好ましい減圧度は約0.1~1atm、最も好ましくは約0.5atmである。典型的な方法の1つは次の通りである：多孔質の応力支持部材を真空ラインに連結したステンレススクリーンガラスフィルターホルダー (Millipore社、MA) 上に置く。骨誘発タンパクとTGF- β の分散体を応力支持部材の上部に置く。次に1atmより低い圧力で骨誘発分散体を移植体の細孔に引き込むと、応力支持部材の細孔に骨誘発分散体が均一に分散する。次に被覆した多孔質移植体を、水分が1重量%より少なくなるまで37℃で乾燥する。次に乾燥した多孔質移植体を非多孔性の応力支持部材と組み合わせて効果的な骨誘発補綴物を得る。

【0033】OFE溶液、または骨誘発タンパクとTGF- β とを含有する分散体を、応力支持部材上で空気乾燥または凍結乾燥すると、乾燥した骨誘発補綴物が得られる。典型的な方法は次のとおりである：

- (1) 上記のOFEをHCl (pH2.0) に溶解させて0.5~1mg/mlのOFEを含有する溶液を調製する；
- (2) OFE溶液を0.2 μ mフィルターより滅菌濾過する；
- (3) OFE溶液とコラーゲン溶液 (CIS) とを混合する；
- (4) OFE/CIS混合液を、0.02MNa₂HPO₄、pH7.2と一緒にして、室温で1晩を要して沈澱させ、OFE/繊維状コラーゲン (FC) 沈澱物を得る；
- (5) 沈澱を遠心分離にかけOFE/FCペレットを得る；
- (6) OFE/FCペレットを、リン酸緩衝化生理食塩水で濃度

調整する；

- (7)多孔質移植体をステップ(6)の分散体で被覆する；
(8)被覆した多孔質移植体を、37℃で水分1重量%未満に乾燥させる。

【0034】他の処理法としては、骨誘発組成物を空気乾燥または凍結乾燥して膜またはシートの形に調製し、これで応力支持部材を被覆する方法がある。このような膜の好都合な調製法としては、骨誘発タンパクを含むOFEまたは骨誘発タンパクと、TGF- β とを含有する分散体を精製コラーゲン調製物と結合させ、この組成物を次の米国特許に開示されているように処理する方法がある：米国特許第4,600,533号（1986年7月15日発行）または米国特許第4,689,399号（1987年8月25日発行）、または米国特許第4,725,671号（1988年2月16日発行）。

【0035】これに代る他の処理法の1つは、米国特許第4,563,350号（1986年1月7日発行）に開示されているように、セラミックキャリア中に骨誘発組成物を調製し、得られた骨誘発性粒子を手術時に応力支持部材と宿主組織内の間隙に充填する方法である。

【0036】A. 4. 移植

本発明の骨誘発補綴物の移植には特に治療を施す欠陥に適した方法が採用される。これらの方法はこの分野で通常使用されているものでよく、本発明には含まれない。

【0037】

【実施例】次の実施例は本発明を説明するためのものであって、本発明を制限するものではない。

【0038】B. 1. 骨誘発タンパクを含有する多孔質チタン移植体の調製

a. 精製OFEを次のようにして調製した。まず、鉍物質を除去した骨をカオトロピック性の抽出剤で抽出し、抽出物をゲル濾過して分子量10~30kdのタンパクを含有するフラクションを回収した。このフラクションをCMC-陽イオン交換剤にpH4.5~5.5で吸着させ、約10mMから約150mMのNaClグラジエントで陽イオン交換剤から精製された抽出物を溶出し、精製OFEを得た。

【0039】b. B. 1. aで調製したOFE15mg（乾燥重量）をHCl15ml（pH2.0）に溶解し、約1mg/mlのOFEを含有するOFE溶液を調製した。この溶液を0.2 μ mのフィルターで滅菌濾過した。

【0040】c. B. 1. bで滅菌霧化されたOFE溶液を3mg/mlのコラーゲン溶液（CIS）150mlと混合し、OFE/CIS混合物165mlを得た。この混合物を、0.02MのNa₂HPO₄、pH7.2で室温（20℃）にて1晩を要して沈澱させ、OFE/繊維状コラーゲン（FC）の分散体を得た。

【0041】d. B. 1. cのOFE/FC分散体を13,000×gで20分間遠心分離にかけ、OFE/FCの沈澱物を得た。

【0042】e. B. 1. dの沈澱物にリン酸緩衝化生理食塩水を加え、総タンパク濃度を65mg/mlに調整した。

【0043】f. 直径1cm、厚さ0.17cm、ポイドポリウ

ーム約33%の多孔質チタンディスクの表面を被覆するのにB. 1. eのOFE/FCの分散体約40mlを使用した。

【0044】g. その結果得られた湿ったOFE/FC/チタン移植体は、移植体1個につきOFE約80 μ gとFC2.5mgとを有していた。

【0045】h. この湿ったOFE/FC/チタン移植体をインキュベートし、37℃で乾燥した（水分1重量%未満）。

【0046】B. 2. 骨誘発性タンパクを有する多孔質チタン移植体の移植

a. チタン移植体の骨内方成長を次の実験で調べた。まず、下記移植体処方物をB. 1に記載したように調整した：

1. 直径1cm、厚さ0.17cmで約33%のポイドボリュームを有するFC2.5mgの多孔質チタンディスク（FC/チタン移植体）；および

2. 上記と同様でOFE80 μ g、FC2.5mgの多孔質チタン移植体（OFE/FC/チタン移植体）。

【0047】この実験では雄のSprague-Dawleyラットを12匹使用し、各テストグループに6匹ずつ割り当てた。試料を各ラットの胸部皮下に標準的手法を用いて外科的に移植した。各テストグループから14日目と28日目に組織学的分析のため外植片を採取した。

【0048】14日目には、FC/チタン移植体には軟骨または骨の形成は認められなかった。繊維結合組織のチタン移植体孔内への湿潤が低~中程度に認められ、少量の大食細胞が存在していた。巨細胞は存在していなかった。

【0049】OFE/FC/チタン移植体を含有する外植片は、中程度~良好な石灰化軟骨形成を示し、また移植体表面状には低~中程度の骨形成が認められた。チタン移植体の孔の一部には中程度~良好な繊維性結合組織の湿潤がみられ、そして少量の大食細胞と、PMNおよび好酸球が存在していた。巨細胞は存在していなかった。

【0050】FC/チタン移植体では28日目まで軟骨あるいは骨の形成は認められなかった。しかし、繊維性結合組織のチタン移植体孔内への良好~優秀な浸潤が認められた。大食細胞の量には変化はなかった。PMNと好酸球とは消失していた。OFE/FC/チタン移植体を含む外植片は14日目にみられた軟骨がすべて28日目では骨に置き変わり、成熟骨を示した。良好な結合組織成長および大部分あるいは全部のチタン孔内への中程度の骨の内方成長が観察された。組織検査ではこれらの外植片には炎症性細胞あるいは巨細胞は検出されなかった。

【0051】

【発明の効果】応力を支持する骨の取替えまたは部分的な取替えを行うための応力支持補綴物は、骨形成因子抽出物または精製された骨形成誘発タンパクと組合せて、また必要に応じて薬学的に容認し得る担体に含有させたTGF- β 補因子と組合せて、多孔質領域を有する応力支持

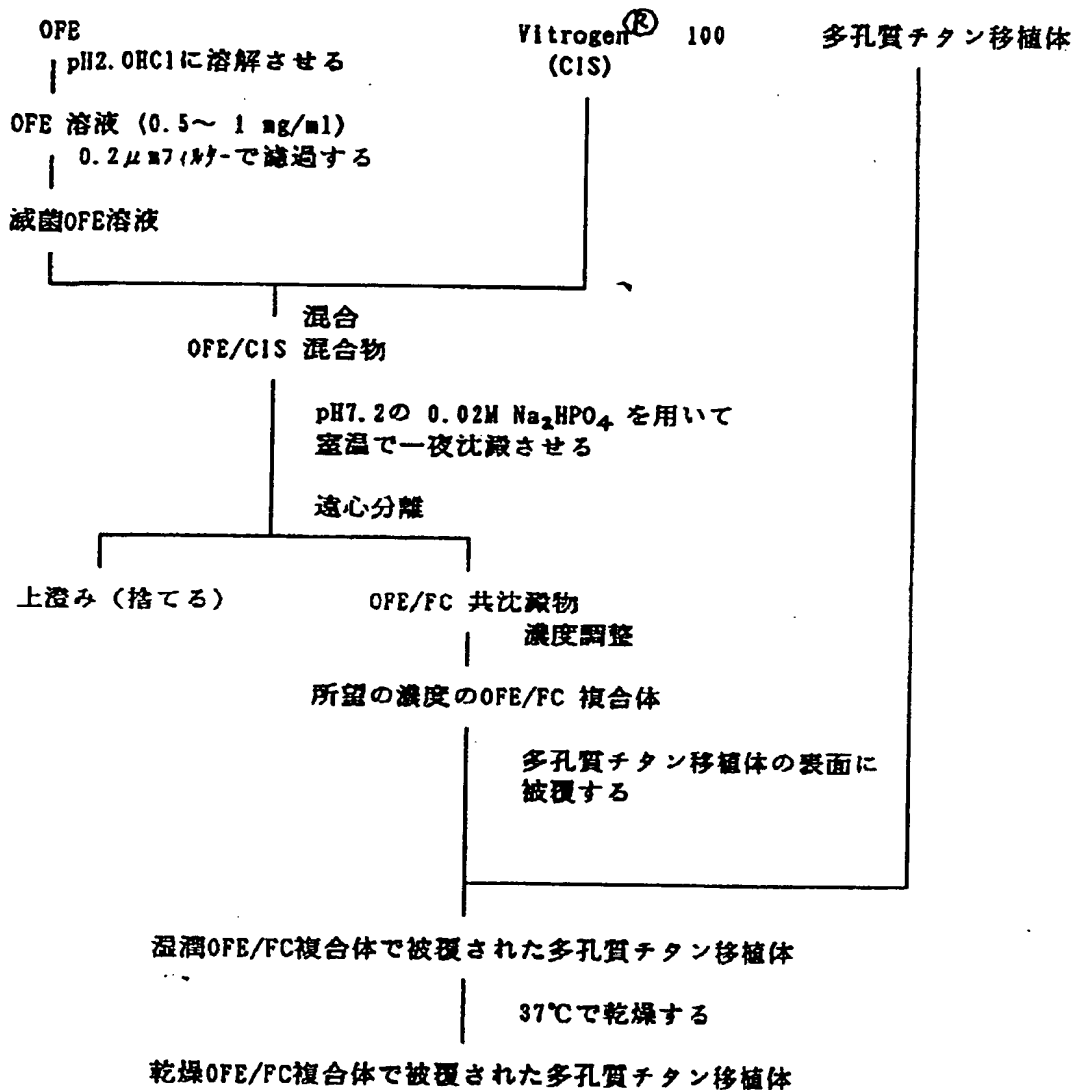
部材を提供することによって、骨の内方成長により適所に固定される。この担体は、好ましくはコラーゲン組成物またはセラミックである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 B. 1. 節で説明した本発明の補綴物の製造方法のフローチャートを示す図である。

【図1】

OFE/FC複合体で被覆された多孔質チタン移植体の調製



フロントページの続き

(72)発明者 ロサ アームストロング
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303
パロ アルト, ルイス ロード 2106

(72)発明者 ロバート チャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010
ヒルズボロウ, エッジコート ドライブ
2155